

#2



별첨 사본은 아래 출원의 원본과 동일함을 증명함.

This is to certify that the following application annexed hereto
is a true copy from the records of the Korean Intellectual
Property Office.

출원 번호 : 10-2003-0004565
Application Number

출원 년 월 일 : 2003년 01월 23일
Date of Application JAN 23, 2003

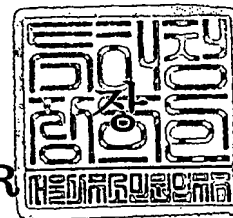
출원인 : (주)안트로젠
Applicant(s) ANTEROGEN CO., LTD.



2004 년 04 월 14 일

특 허 청

COMMISSIONER



**PRIORITY
DOCUMENT**

SUBMITTED OR TRANSMITTED IN
COMPLIANCE WITH RULE 17.1(a) OR (b)

【서지사항】

【서류명】	서지사항 보정서
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2004.01.02
【제출인】	
【명칭】	(주)안트로젠
【출원인코드】	1-2000-043656-3
【사건과의 관계】	출원인
【대리인】	
【성명】	이병현
【대리인코드】	9-1999-000297-5
【포괄위임등록번호】	2000-053300-9
【사건의 표시】	
【출원번호】	10-2003-0004565
【출원일자】	2003.01.23
【심사청구일자】	2003.01.23
【발명의 명칭】	세포 이식을 위한 세포의 생산 방법
【제출원인】	
【접수번호】	1-1-2003-0024530-34
【접수일자】	2003.01.23
【보정할 서류】	특허출원서
【보정할 사항】	
【보정대상항목】	발명자
【보정방법】	정정
【보정내용】	
【발명자】	
【성명의 국문표기】	크로센트 , 제프리, 디.
【성명의 영문표기】	CHOISSANT, Jeffrey, D.
【주소】	미국 매사추세츠 02066 시츄에이트 12 시걸 레인
【주소의 영문표기】	12 Seagull Lane, Scituate, MA 02066 (US)
【국적】	US

【발명자】**【성명의 국문표기】**

유희원

【성명의 영문표기】

Y00,Hee-Won

【주민등록번호】

641013-2009316

【우편번호】

137-069

【주소】

서울특별시 서초구 방배본동 궁전아파트 B동 907호

【국적】

KR

【취지】

특허법시행규칙 제13조·실용신안법시행규칙 제8조의 규정에 의하여 위와 같 이 제출합니다. 대리인
이병현 (인)

【수수료】**【보정료】**

0 원

【기타 수수료】

0 원

【합계】

0 원

【첨부서류】

1. 기타첨부서류[발명자삭제사유서]_1통

【서지사항】

【서류명】	특허출원서
【권리구분】	특허
【수신처】	특허청장
【제출일자】	2003.01.23
【발명의 명칭】	세포 이식을 위한 세포의 생산 방법
【발명의 영문명칭】	METHOD OF PREPARING CELL FOR TRANSPLANTATION
【출원인】	
【명칭】	(주)안트로젠
【출원인코드】	1-2000-043656-3
【대리인】	
【성명】	이병현
【대리인코드】	9-1999-000297-5
【포괄위임등록번호】	2000-053300-9
【발명자】	
【성명의 국문표기】	리 , 아이크, 더블유.
【성명의 영문표기】	LEE, Ike, W.
【주소】	미국 매사추세츠 02062 노르우드 178 엣지힐 로드
【주소의 영문표기】	178 Edgehill Road, Norwood, MA 02062 (US)
【국적】	US
【발명자】	
【성명의 국문표기】	크로센트 , 제프리, 디.
【성명의 영문표기】	CROISSANT, Jeffrey, D.
【주소】	미국 매사추세츠 02066 시츄에이트 12 시걸 레인
【주소의 영문표기】	12 Seagull Lane, Scituate, MA 02066 (US)
【국적】	US
【발명자】	
【성명의 국문표기】	유희원
【성명의 영문표기】	YOO, Hee-Won
【주민등록번호】	641013-2009316
【우편번호】	137-069
【주소】	서울특별시 서초구 방배본동 궁전아파트 B동 907호
【국적】	KR

【심사청구】

청구

【취지】

특허법 제42조의 규정에 의한 출원, 특허법 제60조의 규정에 의한 출원심사를 청구합니다. 대리인 이병현 (인)

【수수료】

【기본출원료】

20. 면 29,000 원

【가산출원료】

0 면 0 원

【우선권주장료】

0 건 0 원

【심사청구료】

12 항 493,000 원

【합계】

522,000 원

【첨부서류】

1. 요약서·명세서(도면)_1통

【요약서】**【요약】**

본 발명은 세포 이식을 위한 세포의 생산 방법 및 이와 같이 생산된 세포를 이용하여 장애를 치료하는 방법에 관한 것으로, (a) 불멸화(immortalized) 되지 않는 골수 줄기 세포를 공급하는 단계; (b) 상기 골수 줄기 세포를 심근 아세포로 분화시키도록 유도하는 조건 하에 IGF-1을 포함하는 배양액 중에서 배양하는 단계; (c) 단계 (b)의 세포의 분화 상태를 모니터링하는 단계; 및 (d) 상기 세포의 약 50% 이상이 심근 아세포일 때 단계 (b)의 세포를 수집하는 단계를 포함하는 본 발명의 포유류 심근 조직으로 이식하기 위한 세포의 생산 방법에 따르면, 포유동물 심장 조직에 이식하기 위한 세포를 고수율로 생산할 수 있으며, 이와 같이 생산된 세포를 이용하여 불완전한 심장 기능에 의한 장애를 치료할 수 있다.

【대표도】

도 2

【색인어】

줄기 세포, 이식, 분화, 심근 조직, 심근 아세포, IGF-1.

【명세서】**【발명의 명칭】**

세포 이식을 위한 세포의 생산 방법{METHOD OF PREPARING CELL FOR TRANSPLANTATION}

【도면의 간단한 설명】

도 1은 인간 유래 골수 줄기 세포를 성장인자와 함께 배양한 후 MEF-2, GATA, 및 Desmin 특이적 항체를 사용하여 분화된 인간 유래 골수 줄기 세포의 염색과 형태학적 사진을 음성 대조군과 함께 보여주는 현미경 사진,

도 2는 인간 유래 골수 줄기 세포를 IGF-1의 존재 또는 부재하에서 성장인자와 함께 배양한 후 MEF-2 특이적 항체를 사용하여 분화된 인간 유래 골수 줄기 세포의 염색과 형태학적 사진을 보여주는 현미경 사진.

【발명의 상세한 설명】**【발명의 목적】****【발명이 속하는 기술분야 및 그 분야의 종래기술】**

- <3> 본 발명은 세포 이식을 위한 세포의 생산 방법 및 이와 같이 생산된 세포를 이용하여 장애를 치료하는 방법에 관한 것이다.
- <4> 골수가 순환하는(circulating) 심근세포 전구체(progenitor)의 in vivo source라는 가능성이 제시되었다. 실험을 통하여 이식된 골수 유래 세포가 이영양증(dyrophic) 쥐의 심장에 골고루 퍼지는 것을 관찰하였다. 비록 이들 세포의 분자적 특징을 규명하지는 못하였으나, 이식된 세포가 심장 조직 내에 존재한다는 것은 이 세포가 심근 세포임을 나타낸다.

- > 5-아자사이티딘(5-azacytidine)과 같은 유도 물질을 이용하여 박동하는 심근 세포를 유도할 수 있는 것으로 알려져 있는 등, 골수 줄기 세포의 분화능력은 이미 알려져 있다. 이러한 결과에 근거하여, 골수 줄기 세포가 심장 이상이나 심장 질환 치료시 세포의 자원으로 사용될 수 있다.
- 6> 골수 줄기 세포의 치료제로서의 가능성에도 불구하고, 현재 심장 조직에 세포를 이식하는 방법에 있어서는 환자 조직에의 생착률이 낮아 임상적으로 아직 적당하지 못하다. 그 예로, 골수 줄기 세포를 이식한 쥐 중 40%에서만 심근 조직이 회복되었다고 Orlic 등이 보고하였다(Orlic *et al.*, *Nature* 410: 701~705, 2001).
- 7> 본 출원인에 의한 선출원인 국제출원 공개 WO 02/083864에서는 세포이식 방법 및 시약에 대하여 기술하고 있는데, 포유류 심근 조직으로 이식하기 위한 세포의 생산 방법으로서, (a) 불멸화(immortalized)되지 않는 골수 줄기 세포를 공급하는 단계; (b) 상기 세포를 심근 아세포로 분화시키도록 유도하는 조건 하에서 상기 골수 줄기 세포를 배양하는 단계; (c) 단계 (b)의 세포의 분화 상태를 모니터링하는 단계; 및 (d) 상기 세포의 적어도 약 10%에서 많게는 100%가 심근 아세포일 때 단계 (b)의 세포를 수집하는 단계를 포함하는 방법이 개시된다.
- 8> 이와 같은 세포이식 기술에서는 골수 줄기 세포로부터 심근 아세포를 고수율로 생산하는 것이 가장 중요한데, 상기 발명에서는 그 수율이 높지 않다는 단점이 있다.
- 9> 이상과 같은 이유로, 높은 생착률과 높은 세포 생존률을 갖는 세포 이식 방법이 필요하다.

【발명이 이루고자 하는 기술적 과제】

- 0> 본 발명의 목적은, 포유동물 심장 조직에 이식하기 위한 세포를 고수율로 생산하는 방법, 그리고 이와 같이 생산된 세포를 이용하여 불완전한 심장 기능에 의한 장애를 치료하는 방법을 제공하고자 하는 것이다.

【발명의 구성 및 작용】

- 1> 상기 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 포유류 심근 조직으로 이식하기 위한 세포의 생산 방법은 다음 단계를 포함한다:
- 2> (a) 불멸화(immortalized) 되지 않는 골수 줄기 세포를 공급하는 단계;
- 13> (b) 상기 골수 줄기 세포를 심근 아세포로 분화시키도록 유도하는 조건 하에 IGF-1을 포함하는 배양액 중에서 배양하는 단계;
- 14> (c) 단계 (b)의 세포의 분화 상태를 모니터링하는 단계; 및
- 15> (d) 상기 세포의 약 50% 이상이 심근 아세포일 때 단계 (b)의 세포를 수집하는 단계.
- 16> 상기 다른 목적을 달성하기 위한, 본 발명의 포유류에서 불완전한 심장 기능에 의한 장애를 치료하는 방법은 다음 단계를 포함한다:
- 17> (a) 상기 포유류로부터 골수 줄기 세포를 분리하는 단계;
- 18> (b) 상기 골수 줄기 세포를 심근 아세포로 분화시키도록 유도하는 조건 하에 IGF-1을 포함하는 배양액 중에서 배양하는 단계;
- 19> (c) 단계 (b)의 세포의 분화 상태를 모니터링하는 단계; 및
- 20> (d) 상기 세포의 약 50% 이상이 심근 아세포일 때 단계 (b)의 세포를 수집하는 단계; 및

- 1> (e) 상기 심근 아세포를 상기 포유류로 이식하는 단계.
- 2> 본 발명은, in vitro에서 포유류 심장 조직에 이식하기 위한 세포를 생산하는 단계에 있어서, 골수 줄기 세포를 IGF-1(Insulin-like Growth Factor-1)을 포함하는 배양액 중에서 배양할 경우 골수 줄기 세포로부터 심근 아세포로의 분화율을 극대화할 수 있음을 발견함으로써 이루어진 것이다. 이와 같이 IGF-1을 첨가하여 배양한 세포에서는 MEF2 발현이 더 강하게 나타나는데, 이는 그 세포가 심근 아세포의 성격을 더 강하게 갖고 있음을 의미한다.
- 3> 본 발명의 방법에서 세포는 인간, 돼지, 비비의 골수 줄기 세포(BMSCs)를 사용할 수 있다. 또한, 이식은 자가 이식, 즉, 치료 대상 포유류로부터 얻은 세포를 이식하는 것이 바람직하다. 수집한 세포 중 적어도 약 15%, 20%, 30%, 40% 또는 50%가 심근세포 전구체와 같은 심근 아세포인 것이 바람직하고, 수집한 세포 중 많으면 60%, 70%, 80%, 95% 또는 99%가 심근 아세포인 것이 바람직하다. 가장 바람직한 것은 수집한 세포 중 적어도 약 50% 내지 약 80%가 심근 아세포인 것이다.
- 24> 또한, 본 발명에서는 불완전한 심장 기능 질환이 있는 인간과 같은 포유류를 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 다음 세 가지 형태의 세포를 포유류의 심장 조직에 이식하는 단계를 포함한다: 심장 기능을 향상시키기 위한 충분한 양의 (1) 심근 세포 또는 심근 세포 전구체; (2) 내피 세포 또는 내피 세포 전구체; 및 (3) 혈관 평활근 세포 또는 혈관 평활근 세포 전구체.
- 25> 여기에서는, 심근 세포 전구체(1×10^6)와 다른 두 세포를 약 10:1:1(심근 세포 전구체:내피 세포 전구체:혈관 평활근 세포 전구체)의 비율로 심근층에 이식하는 것이 바람직하며, 다른 비율로도 사용할 수 있다.

- 3> 세포가 이식된 후, 각 세포 타입에 따라 내피 세포 전구체는 심장 내막에 가깝게, 혈관 평활근 세포 전구체는 중간에, 그리고 심근 세포 전구체는 심장 외막에 가깝게 층을 이루게 될 것이다.
- 7> 심근 세포가 되도록 세포를 유도하는 기술은 매우 많다. 예를 들어, 골수 줄기 세포를 심근 세포로 유도하는 BMP2(Bone Morphogenic Protein 2)나 bFGF(basic Fibroblast Growth Factor)를 함유한 배지에서 배양할 수 있다. 본 발명에서는 심근 세포로 분화시키기 위해 골수 줄기 세포에 IGF-1을 다양한 농도로 첨가함으로써 골수 줄기 세포로부터 심근아세포로의 분화율을 극대화한 것을 특징으로 한다. 이 때 IGF-1은 100 pg/ml 내지 25 ng/ml의 농도로 배지 중에 첨가할 수 있다. 이들 방법은 본 발명의 실제에서 사용될 것이다.
- 18> 유사 분열하는 세포가 유사분열이 끝난 세포보다 심근층에 좀 더 쉽게 융합될 수 있기 때문에, (c) 단계의 이식하는 세포 중 적어도 25%, 50%, 75%, 90%, 95% 또는 그 이상이 유사 분열 세포 전구체인 것이 바람직하다.
- 29> 본 발명의 방법에서는 심장 기능을 향상시키기 위해 충분한 양의 심근 세포나 심근 전구 세포를 이식하는 것을 특징으로 한다. 세포는 줄기 세포(즉, 골수 줄기 세포)에서 유래하는 것이 바람직하다. 덧붙여, 이식 세포의 생존률을 높이기 위해서 캐스페이스 억제제(caspase inhibitor: zVAD-fmk)와 같은 항 괴사 물질(anti-apoptotic agent)을 이식할 때 같이 주입할 수 있다.
- 30> 본 발명에서는 또한 포유류(예를 들어, 인간)에 이식하기 위한 세포를 생산하는 방법을 제공한다. 본 방법은 (a) 골수 줄기 세포 군집을 공급하는 단계; (b) 혈관 평활근 세포, 내피 세포, 심장 외막 세포, 지방세포, 파골 세포, 골 모세포, 대식 세포, 신경 세포 전구체, 신경 세포, 성상세포, 골 근육 세포, 평활근 세포, 췌장 세포 전구체, 췌장 베타 세포 및 간(肝)세

포로 구성되는 그룹으로부터 선택된 세포 형태로 분화되도록 유도할 수 있는 조건에서 세포를 배양하는 단계; (c) (b) 단계에서 세포의 분화 단계를 모니터링하는 단계; 및 (d) 유도된 세포에서 특이적으로 발현하는 단백질을 확인할 수 있는 세포가 적어도 약 50% 이상일 때 세포를 수집하는 단계를 포함한다. 여기에서, 적당한 마커(marker)는 이하에 서술된다. 골수 줄기 세포는 인간이나 돼지, 비비의 골수 줄기 세포일 수 있다.

- 1> 하나의 실시예에서, 본 발명의 방법은 (e) 포유류(예를 들어, 인간)에 (d) 단계의 세포를 이식하는 단계를 포함한다. 이식은 자가 이식, 즉, 골수 줄기 세포를 추출한 포유류에 다시 세포를 이식하는 것이 바람직하다. (b), (c) 단계인 배양과 모니터링은, 원하는 분화 계통(lineage)에서 검출 가능한 양의 마커가 발현되는 세포가 적어도 약 15%, 20%, 30%, 40% 또는 50%에서 많게는 약 60%, 70%, 80%, 90%, 95% 또는 99%일 때까지 수행될 수 있다. 바람직하게는, (b)와 (c) 단계의 배양과 모니터링은 원하는 분화 계통에서 검출 가능한 양의 마커가 발현되는 세포가 약 50% 내지 약 80%일 때까지 수행한다.

- 12> 본 발명은 또한 불완전한 심장 기능 질환이 있는 포유류, 바람직하게는 인간을 치료하는 방법을 제공한다. 본 방법은 (a) 치료를 위해 포유류로부터 골수 줄기 세포를 분리하는 단계; (b) 골수 줄기 세포를 심근 아세포로 분화시키는 조건에서 배양하는 단계; (c) (b) 단계의 세포가 분화하는 단계를 모니터링하는 단계; (d) 심근 아세포가 약 10% 내지 100%일 때 (b) 단계의 세포를 수집하는 단계; 및 (e) 심근 아세포를 포유류에게 이식하는 단계를 포함한다.

- 33> 본 명세서에서 "줄기 세포"는 (i) 자가 증식할 수 있고, (ii) 심근 세포, 내피 세포, 및 혈관 평활근 세포 중에서 원하는 한 형태를 포함하는 여러 형태로 분화할 수 있는 세포를 의미한다.

- 10> "골수 중간엽 줄기 세포(BMSC)"는 CD45가 없는 골수 중간엽 유래 줄기 세포를 의미한다. 골수 중간엽 줄기 세포는 또한 골수 줄기 세포나 골수 유래 다잠재성 전구 세포라고도 불린다.
- 15> "치료(treating)"는 적어도 하나의 이상 반응이나 불완전한 심장 기능을 나타내는 비정상적인 증후를 경감시키거나 감소시키는 것을 의미한다. 이상 반응이나 심장 기능 이상 증상은 여러 가지이고 잘 정의되어 있다. 이상 반응이나 심장 기능 이상 증상의 몇 가지 예로는 호흡 곤란, 가슴 통증, 심계항진, 현기증, 기절, 부종, 청색증, 창백, 피로, 사망 등이 포함된다. 이상 반응이나 매우 다양한 심장 기능 이상 증상의 예는 Robbins, S.L. 등의 문헌(Robbins, S.L. *et al.*, 1984, *Pathological Basis of Disease*, p547-609, W.B. Saunders Company, Philadelphia)과 Schroeder, S.A. 등의 문헌(Schroeder, S.A. *et al.*, 1992, *Current Medical Diagnosis & treatment*, p257-356, Appleton & Lange, Connecticut)에 추가적으로 기재되어 있다.
- 16> "불완전한 심장 기능에 의한 이상 질환"은 정상적인 심장 기능의 결함이나 장애 또는 비정상적 심장 기능의 존재를 의미한다. 비정상적 심장 기능은 질병, 상해 및/또는 노화의 결과일 수 있다. 여기에서 정의되는 비정상적 심장 기능은 심근 세포나 심근 세포 군집의 형태학적 및/또는 기능적인 비정상을 포함한다. 형태학적 및 기능적 비정상의 몇 가지 예로는 심근 세포의 사멸 및/또는 물리적 저하, 심근 세포의 비정상적인 증식 형태, 심근 세포 사이에 물리적 결함의 비정상, 심근 세포에 의한 구성물질의 과소 또는 과잉 생산, 정상적으로 생산하는 구성 물질의 생산 결여, 전기적 자극 전달의 비정상적 형태나 비정상적 횡수, 및 전술한 비정상에 의한 결과인 심장압의 변화 등을 포함한다. 비정상적 심장 기능은 허혈성 심장 질환, 예로 협심증, 심근 경색, 만성 허혈성 심장 질환, 고혈압성 심장 질환, 폐질환성 심장 질환(폐질환), 심장 판막성 심장 질환, 예로 류머티스성 발열, 승모판 탈출, 승모판륜(mitral

annulus)의 석회화, 악성 종양성 심장 질환, 감염성 심장내막염, 선천성 심장 질환, 심근 질환, 예로 심근염, 심근증, 율혈성 심장 결함에 의한 심장 질환, 그리고 심장암, 예로 일차 육종, 이차 종양 등을 포함하는 많은 결함과 함께 나타난다.

- 7> "적용(administering)", "주입(introducing)", "이식(transplanting)"은 같은 의미로 사용되며, 원하는 곳에 세포가 생착할 수 있는 방법으로 인간 환자와 같은 피실험자에 본 발명에 따른 심근 세포를 넣는 것을 의미한다.
- 8> "심장 세포(cardiac cell)"는 분화된 심장 세포(예를 들어, 심근 세포) 또는 심장 세포를 생성하거나 심장 세포로 분화되도록 결정된 세포(예를 들어, 심근 모세포 또는 심근 아세포)를 의미한다.
- 39> "심근 세포(cardiomyocyte)"는 심장에서 검출 가능한 양의 심장 마커(예를 들어, 알파 미오신 heavy chain, cTnI, MLC2v, 알파 심장 액틴, in vivo에서 Cx43)를 발현하고, 수축하며, 증식은 하지 않는 근육 세포를 의미한다.
- 40> "심근 모세포(cardiomyoblast)"는 심장에서 검출 가능한 양의 심장 마커를 발현하고, 수축하고, 증식하는 세포를 의미한다.
- 41> "심근 아세포(cadiomyogenic cell)"는 검출 가능한 양의 Csx/Nkx2.5 RNA 또는 단백질을 발현하고, 조직화된 육종 구조나 수축이 보이지 않고, 검출 가능한 양의 미오신 heavy chain 단백질이 발현되지 않는 세포를 의미한다.
- 42> 배양된 골수 줄기 세포의 분화를 언급할 때 "하나의 세포 형태로의 특이적인 유도"는 적어도 50% 이상의 줄기세포가 원하는 세포 형태(즉, 심근 세포)로 분화되는 배양을 의미한다.

3> 단백질의 "검출 가능한 양"은 다음과 같이 여기에 제공된 방법을 사용한 면역세포화학법에 의해 검출되는 단백질의 양을 의미한다. 세포가 CsX/Nkx2.5 또는 미오신 heavy chain으로 표지되어 있는지를 확인하는 한 가지 방법이 다음에 제공된다. 먼저, 배양된 세포를 얼음에서 20 분간 4% 포름알데히드를 가지고 고정시킨 다음, 0.2% triton-X100이 들어있는 PBS에서 15 분간 방치한다. PBS로 세 번 세척한 후, 세포를 15 분간 blotting 용액(PBS에 1% BSA 와 0.2% Tween 20를 첨가)에 방치한다. 이 시료를 다음 항체 중 하나를 가지고 처리한다: anti-Csx (1:100~1:200, from S. Izumo, Harvard Medical School, Boston MA), MF-20 (1:50~1:200, from Developmental Studies Hybridoma bank, University of Iowa, Iowa City Iowa), anti-desmin (1:100~1:200, from Sigma-Aldrich, Inc., St. Louis MO). 필요에 따라, 같은 농도의 동종 대조군(Csx는 normal rabbit serum, MF-20는 mouse IgG2b, desmin는 mouse IgG1)과 함께 4 °C 항습조에서 밤새도록 반응시킨다. 시료 슬라이드를 세척 용액(PBS에 0.5% Tween 20 첨가)으로 세 번 세척한 다음, 이차 항체와 반응시킨다(Csx는 donkey anti-rabbit IgG, MF-20 과 anti-desmin는 donkey anti-mouse IgG, from Jackson ImmunoResearch Laboratories, Inc.). 세 번 세척한 후 형광 현미경(예를 들어, 형광 부속물이 부착된 Nikon TS100 현미경)으로 관찰하여 형광을 띠는 세포의 수를 계산한다.

44> 이하, 본 발명의 다른 특징과 장점은 다음과 같이 그것에 관하여 구체적으로 언급한 기술과 청구범위를 통해 나타낸다.

45> 본 발명자들은 발생학적으로 커미티드(committed)된 상태이지만 분화되지는 않은 세포의 이식이 목표 조직에서 이식 세포의 생존과 생착력, 적응력을 증가시킨다는 것을 발견하였다.

- 6> 또한, 심근층 부위에서 혈관과 심근 조직이 같이 재생되는 세포이식 치료법을 발견하였다. 이러한 방법은 심근 세포, 내피 세포, 또는 혈관 평활근 세포 등 세 가지 세포 형태 중 하나로 되기 시작한 미분화된 세포의 이식을 포함한다.
- 7> 본 발명에서는 줄기 세포 중 인간에게서 추출한 줄기 세포를 사용하여 심근아세포로 분화시켰다.
- 8> 세포 이식을 위하여 충분한 양의 세포를 공급하는 것이 바람직하다. 따라서, 이식되는 세포는 줄기 세포에서 유래된다. 적절한 줄기 세포중 하나는 골수 줄기 세포로, 이는 성인의 골수에서 채취할 수 있다. 일단 채취된 골수 줄기 세포는 아래 설명처럼 성장인자를 처리하여(여기에서는 priming으로 언급) 심근 세포 계통으로 유도할 수 있다. 본 발명에서는 심근 세포로 분화시키기 위해 골수 줄기 세포에 IGF-1을 다양한 농도로 첨가하여 그 효과를 결정하였다.
- 19> 세포 이식 성공을 위해서는 줄기 세포와 줄기 세포 유도체 준비의 최적화가 아주 중요하다. 세포 이식의 이식률을 극대화하기 위해서는 이식되는 세포가 시작 (commitment)과 분화 중 적절한 단계에 있는 것이 바람직하다.
- 50> 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 더욱 구체적으로 설명한다. 단, 이들 실시예는 본 발명의 예시일 뿐, 본 발명의 범위가 이들만으로 한정되는 것은 아니다.
- 51> 실시예 1: 골수 줄기 세포에서 심근 아세포로의 분화율을 높이기 위한 방법
- 52> 골수는 인간의 성체에서 분리하였다. 골수 줄기 세포를 분리하여 10% 우혈청, 100 M L-아스코르빈산-2-PO₄, 5-15 ng/ml 인간 LIF(leukemia inhibitory factor), 및 20 nM 덱사메타손과 함께 배양하였다. 이와 같은 in vitro 조건에서 골수 줄기 세포는 자가 증식 성질 조건을

유지하였고 성장인자와 같은 분화 시약에 반응성을 잃지 않으면서 계대배양을 통해 증식되었다

- > 성장인자 bFGF(50 ng/ml, from R&D) 및 BMP-2(25 ng/ml, from R&D), 그리고 IGF-1(2 ng/ml, from R&D)의 존재하에서 2 주 동안 배양하였다. 결과는 근육 세포 특이적 마커인 MEF-2, GATA, Desmin을 이용한 면역형광염색을 통해 확인하였다.
- 4> 도 1은 인간 유래 골수 줄기 세포를 성장인자와 함께 배양한 후 MEF-2, GATA, 및 Desmin 특이적 항체를 사용하여 분화된 인간 유래 골수 줄기 세포의 염색과 형태학적 사진을 음성 대조군과 함께 보여주는 현미경 사진이다. 여기에서, 패널 A, E 및 I는 각각 MEF-2, GATA 및 Desmin에 의한 면역형광염색 (immunofluorescence staining) 결과이고, 패널 B, F 및 J는 각 면역형광염색 이미지의 대응하는 페이스 컨트라스트 이미지(phase contrast image)이고, 패널 C, G 및 K는 이소타입(isotype) 음성 대조군의 대응하는 형광 이미지(fluorescent image)이고, 패널 D, H 및 L은 이소타입 대조군의 대응하는 페이스 컨트라스트 이미지이다. 모든 이미지는 40X 배율을 갖는다.
- 5> 이어서, 분리된 인간 골수 줄기 세포를 bFGF와 BMP2 존재하에서, 또는 bFGF, BMP2 및 IGF-1의 존재하에서 각각 처리하고, 1 주간 분화 배지에 노출시킨 후 고정하고 MEF-2에 대한 다클론 항체(Santa Cruz #sc-10794)를 사용하여 MEF-2 면역형광염색을 통해 분석하였다. bFGF, BMP2, 및 IGF-1의 처리 농도와 시험 조건은 위와 같다.
- 56> 도 2는 인간 유래 골수 줄기 세포를 IGF-1의 존재 또는 부재하에서 성장인자와 함께 배양한 후 MEF-2 특이적 항체를 사용하여 분화된 인간 유래 골수 줄기 세포의 염색과 형태학적 사진을 보여주는 현미경 사진이다. 여기에서, 패널 A 및 B는 bFGF 및 BMP2의 존재하에서 배양한 것이고, 패널 C 및 D는 bFGF, BMP2 및 IGF-1의

존재하에서 배양한 결과이다. 또한, A 및 C는 MEF-2에 의한 면역형광염색 결과이고, B 및 D는 대응하는 페이스 컨트라스트 이미지이다. 모든 이미지는 40X 배율을 갖는다. 도 2에서 보듯이, IGF-1 2 ng/ml의 존재하에서 가장 많은 심근 아세포를 얻을 수 있다. 또한 IGF-1과 함께 배양한 세포에서 MEF2의 발현이 더 강하게 나타나는 것을 볼 수 있는데, MEF2의 발현 강도가 강하다는 것은 그 세포가 심근 아세포의 성격을 더 많이 갖고 있음을 의미하는 것이다. 따라서, 본 발명에 따르면 수율 면에서 많은 심근 아세포를 얻을 수 있을 뿐 아니라, 세포 특성 면에서도 원하는 심근 세포 lineage의 성격을 더 많이 갖는 심근 아세포를 얻을 수 있게 된다.

57> 이상과 같은 결과를 볼 때 세포가 배양되는 환경을 조절함으로써 골수 줄기 세포가 심근 아세포로 분화될 수 있는 비율과 양을 조절하여 이를 극대화할 수 있음을 알 수 있다. 본 발명의 이식 방법에 따라, 이식 세포 중 적어도 약 50%는 심근 아세포인 것이 바람직하다. 고함량의 심근 아세포는 이식된 세포의 생착률을 높이는 결과를 가져온다. 적어도 약 50%, 75%, 85%, 90% 또는 95%, 또는 그 이상의 세포가 심근 아세포인 것이 바람직하다.

58> 또한, 본 발명의 방법에 있어서 적절한 인자 또는 조건은 특이적으로 한 가지의 세포로만 유도한다(예를 들어, 심근 세포).

59> 실시예 2: 인간과 다른 포유동물에서의 골수 줄기 세포

60> 본 분야에서 인간 골수 줄기 세포는 심근 세포를 만들 수 있을 것으로 알려져 있다 (Pittenger *et al.*, *Science* 284: 143-147, 1999). 다른 포유동물의 골수 줄기 세포(예를 들어 humanized pig의 골수 줄기 세포) 또한 개발된 발명에 따라 이용이 가능하다(Levy *et al.*, *Transplantation* 69: 272-280, 2000).

【발명의 효과】

- 31> 이상에서 설명한 바와 같이, 본 발명에 따라 골수 줄기 세포를 심근 아세포로 분화시키도록 유도하는 조건 하에 IGF-1을 포함하는 배양액 중에서 배양할 경우, 포유동물 심장 조직에 이식하기 위한 세포를 고수율로 생산할 수 있을 뿐 아니라, 심근 세포 lineage의 성격을 더 많이 갖는 심근 아세포를 얻을 수 있으며, 이와 같이 생산된 세포를 이용하여 불완전한 심장 기능에 의한 장애를 치료할 수 있다.

【특허청구범위】**【청구항 1】**

(a) 불멸화(immortalized) 되지 않는 골수 줄기 세포를 공급하는 단계;

(b) 상기 골수 줄기 세포를 심근 아세포로 분화시키도록 유도하는 조건 하에 IGF-1을 포함하는 배양액 중에서 배양하는 단계;

(c) 단계 (b)의 세포의 분화 상태를 모니터링하는 단계; 및

(d) 상기 세포의 50% 이상이 심근 아세포일 때 단계 (b)의 세포를 수집하는 단계를 포함하는,

포유류 심근 조직으로 이식하기 위한 세포의 생산 방법.

【청구항 2】

제 1 항에 있어서, 상기 골수 줄기 세포가 이식 대상 포유류로부터 유래되는 방법.

【청구항 3】

제 1 항에 있어서, 상기 포유류가 인간인 방법.

【청구항 4】

제 1 항에 있어서, 상기 단계 (d)는 단계 (b)의 상기 세포의 50% 내지 80%가 심근 아세포일 때 수행되는 방법.

【청구항 5】

제 1 항에 있어서, 상기 IGF-1의 농도는 0.1 내지 25 ng/ml인 방법.

【청구항 6】

불멸화(immortalized) 되지 않는 골수 줄기 세포를 심근 아세포로 분화시키도록 유도하는 조건 하에 IGF-1을 포함하는 배양액 중에서 배양하여 수집되는, 포유류 심근 조직으로 이식하기 위한 세포.

【청구항 7】

제 6 항에 있어서, 상기 골수 줄기 세포가 이식 대상 포유류로부터 유래되는 것을 특징으로 하는, 포유류 심근 조직으로 이식하기 위한 세포.

【청구항 8】

제 6 항에 있어서, 상기 포유류가 인간인 것을 특징으로 하는, 포유류 심근 조직으로 이식하기 위한 세포.

【청구항 9】

제 6 항에 있어서, 상기 IGF-1의 농도가 0.1 내지 25 ng/ml인 것을 특징으로 하는, 포유류 심근 조직으로 이식하기 위한 세포.

【청구항 10】

(a) 제 1 항에 따라 생산된 심근 세포 또는 심근 세포 전구체;

(b) 내피 세포 또는 내피 세포 전구체; 및

(c) 혈관 평활근 세포 또는 혈관 평활근 세포 전구체를 포함하는,

불완전한 심장 기능을 특징으로 하는 질환을 갖는 것으로 진단된 포유류의 심근 조직으로 이식하여 포유류를 치료하기 위한 조성물.

【청구항 11】

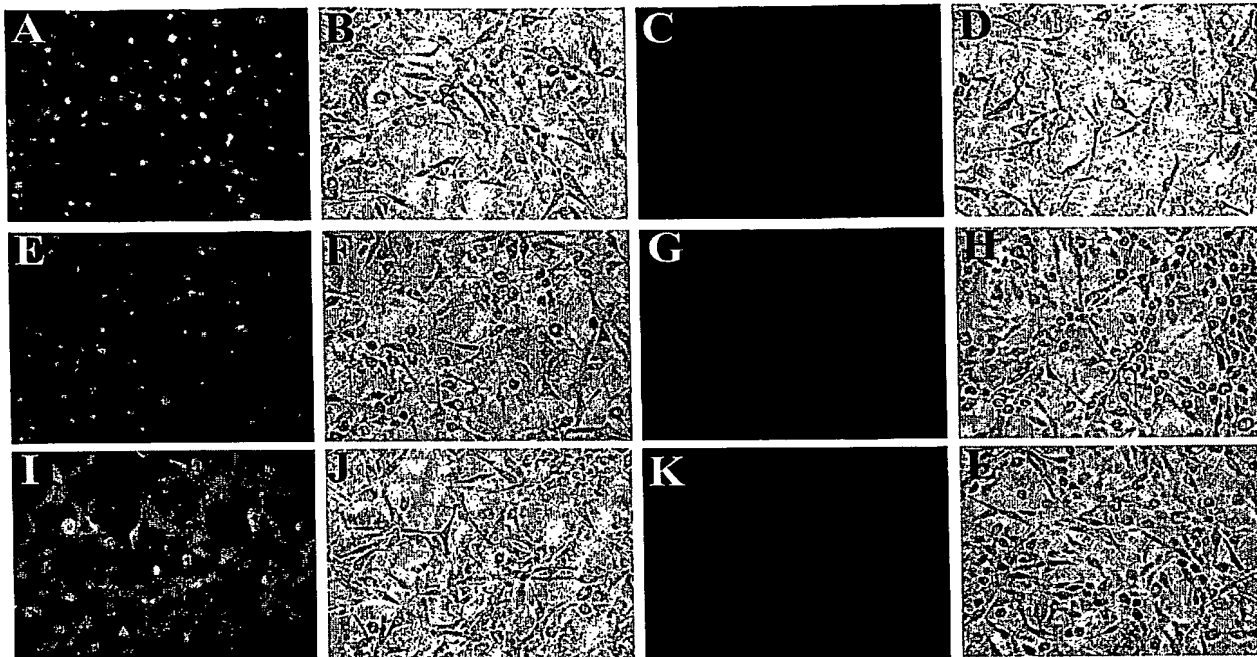
제 10 항에 있어서, 심근 세포 전구체:내피 세포 전구체:혈관 평활근 세포 전구체의 비율이 10:1:1인 것을 특징으로 하는 조성물.

【청구항 12】

제 10 항에 있어서, 상기 포유류가 인간인 것을 특징으로 하는 조성물.

【도면】

【도 1】



【도 2】

